

PCTORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau international

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁵ : C12N 15/12, C07K 13/00, C07H 21/00, C12Q 1/68, G01N 33/68, A61K 31/00, C12N 5/10		A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 94/18319 (43) Date de publication internationale: 18 août 1994 (18.08.94)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR94/00136 (22) Date de dépôt international: 7 février 1994 (07.02.94) (30) Données relatives à la priorité: 93/01392 9 février 1993 (09.02.93) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE [FR/FR]; 101, rue de Tolbiac, F-75654 Paris Cédex 13 (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): AMLAIKY, Nouridine [MA/FR]; 7, rue de Barr, F-67000 Strasbourg (FR). BOSCHERT, Ursula [DE/FR]; 6, cour du Moulin-Zorn, F-67000 Strasbourg (FR). GRAILHE, Régis [FR/FR]; 10, rue Bourtzwiller, F-67000 Strasbourg (FR). HEN, René [FR/FR]; 3, rue Kageneck, F-67000 Strasbourg (FR). MATTHES, Hans [DK/FR]; 4, rue Roppenheim, F-67000 Strasbourg (FR). PLASSAT, Jean-Luc [FR/FR]; 62, route de l'Hôpital, F-67000 Strasbourg (FR).		(74) Mandataire: BECKER, Philippe; Rhone-Poulenc Rorer S.A., Direction Brevets, 20, avenue Raymond-Aron, F-92165 Antony Cédex (FR). (81) Etats désignés: CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i>	
(54) Title: NOVEL POLYPEPTIDES HAVING SEROTONINERGIC RECEPTOR ACTIVITY, NUCLEIC ACIDS CODING THEREFOR AND USE THEREOF (54) Titre: NOUVEAUX POLYPEPTIDES AYANT UNE ACTIVITE DE RECEPTEUR SEROTONINERGIQUE, ACIDES NUCLEIQUES CODANT POUR CES POLYPEPTIDES ET UTILISATIONS (57) Abstract Novel 5HT5b polypeptides having serotonergic receptor activity, genetic material for the expression thereof, any recombinant cell expressing said polypeptides, and use thereof. (57) Abrégé La présente invention concerne de nouveaux polypeptides désignés 5HT5b ayant une activité de récepteur sérotoninergique, le matériel génétique permettant leur expression, toute cellule recombinante exprimant ces polypeptides, et leur utilisation.			

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	MR	Mauritanie
AU	Australie	GE	Géorgie	MW	Malawi
BB	Barbade	GN	Guinée	NE	Niger
BE	Belgique	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IT	Italie	PL	Pologne
BR	Brésil	JP	Japon	PT	Portugal
BY	Bélarus	KE	Kenya	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CN	Chine	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LV	Lettonie	TG	Togo
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DE	Allemagne	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
FR	France			VN	Viet Nam
GA	Gabon				

NOUVEAUX POLYPEPTIDES AYANT UNE ACTIVITE DE RECEPTEUR
SEROTONINERGIQUE. ACIDES NUCLEIQUES CODANT POUR CES
POLYPEPTIDES ET UTILISATIONS

La présente invention concerne de nouveaux polypeptides et le matériel
5 génétique permettant leur expression. Plus particulièrement, elle concerne de
nouveaux polypeptides ayant une activité de récepteur sérotoninergique.

La sérotonine est un neuromodulateur capable d'induire et de moduler une
grande variété de comportements tels que le sommeil, l'appétit, la locomotion,
l'activité sexuelle ou encore la contraction vasculaire. Il est admis que l'activité de la
10 sérotonine est médiée par son interaction avec des récepteurs, désignés récepteurs
sérotoninergiques ou récepteurs 5-HT (pour 5-hydroxytryptamine). Des études de
biologie moléculaire ainsi que des études pharmacologiques ont révélé qu'il existait
un grand nombre de sous-types de récepteurs 5-HT. Les récepteurs 5-HT qui ont été
décrits jusqu'à aujourd'hui appartiennent soit à la famille des récepteurs liés à des
15 canaux ioniques (récepteurs 5-HT₃), soit à la famille des récepteurs qui interagissent
avec des protéines G et qui possèdent sept domaines transmembranaires. Par ailleurs,
l'analyse des séquences d'acides aminés a montré que les récepteurs 5-HT
interagissant avec des protéines G peuvent être sous-divisés en deux groupes
distincts : Les récepteurs 5HT₁, comprenant les sous-types mammifères 5HT_{1A},
20 5HT_{1B} et 5HT_{1D} ainsi que trois récepteurs 5HT de drosophile; et les récepteurs
5HT₂ comprenant les sous-types 5HT₂ et 5HT_{1C}.

Ces récepteurs ne sont sans doute pas les seuls récepteurs 5HT existant, dans
la mesure où des études pharmacologiques ont révélé d'autres sous-types tels que les
récepteurs 5HT₄ ainsi que certains récepteurs apparentés au sous-type 5HT₁
25 (récepteurs "5HT₁ like"). De plus, des études supplémentaires de biologie
moléculaire ont également révélé des hétérogénéités au sein des sous-types
5HT_{1B/1D}.

La présente invention résulte de la mise en évidence de nouveaux
polypeptides ayant une activité de récepteur sérotoninergique. Bien qu'appartenant à
30 la famille des récepteurs qui interagissent avec des protéines G, ces nouveaux
polypeptides diffèrent des récepteurs sérotoninergiques déjà décrits (5HT₁, 5HT₂,
5HT₃ et 5HT₄) du point de vue structural comme du point de vue pharmacologique.
Plus particulièrement, l'invention résulte de l'isolement et de la caractérisation de ces

nouveaux polypeptides, désignés 5HT5b, ainsi que du matériel génétique permettant leur expression ou leur identification.

Un premier objet de l'invention réside donc dans des polypeptides comprenant tout ou partie de la séquence peptidique SEQ ID n° 2 ou d'un dérivé de celle-ci.

Au sens de la présente invention, le terme dérivé désigne toute molécule obtenue par modification de nature génétique et/ou chimique de la séquence peptidique SEQ ID n° 2. Par modification de nature génétique et/ou chimique, on peut entendre toute mutation, substitution, délétion, addition et/ou modification d'un ou plusieurs résidus. De tels dérivés peuvent être générés dans des buts différents, tels que notamment celui d'augmenter l'affinité du peptide pour son(ses) ligand(s), celui d'améliorer ses niveaux de production, celui d'augmenter sa résistance à des protéases, celui d'augmenter et/ou de modifier son activité, ou celui de lui conférer de nouvelles propriétés pharmacocinétiques et/ou biologiques. Parmi les dérivés résultant d'une addition, on peut citer par exemple les polypeptides chimères comportant une partie hétérologue supplémentaire liée à une extrémité. Le terme dérivé comprend également les polypeptides homologues au polypeptide SEQ ID n° 2, issus d'autres sources cellulaires et notamment de cellules d'origine humaine, ou d'autres organismes, et possédant une activité de même type. De tels polypeptides homologues peuvent être obtenus par des expériences d'hybridation comme décrit dans les exemples.

Préférentiellement, les polypeptides de l'invention sont des polypeptides possédant la capacité de lier la sérotonine. Encore plus préférentiellement, il s'agit de polypeptides ayant une activité de récepteur sérotoninergique. Toujours selon un mode préféré, les polypeptides de l'invention sont susceptibles d'être reconnus par des anticorps reconnaissant la séquence peptidique SEQ ID n° 2 complète.

Un mode de réalisation particulier de l'invention est représenté par le polypeptide 5HT5b comprenant toute la séquence peptidique SEQ ID n° 2. Comme indiqué dans les exemples, ce polypeptide peut être exprimé dans différents types cellulaires pour former un récepteur sérotoninergique fonctionnel.

Les polypeptides de l'invention peuvent être obtenus par expression dans un hôte cellulaire d'une séquence nucléotidique telle que décrite ci-dessous, par synthèse

chimique, sur la base de la séquence SEQ ID n° 2 en utilisant les techniques connues de l'homme du métier, ou par une combinaison de ces techniques.

Dans ce qui suit, les polypeptides de l'invention tels que définis ci-dessus sont désignés par polypeptides 5HT5b.

5 La présente invention a également pour objet toute séquence nucléotidique codant pour un polypeptide 5HT5b. Plus préférentiellement, il s'agit d'une séquence choisie parmi :

- (a) tout ou partie de la séquence nucléotidique SEQ ID n° 1 ou de son brin complémentaire,
- 10 (b) toute séquence hybridant avec une séquence (a) et codant pour un polypeptide tel que défini précédemment, et,
- (c) les séquences dérivées des séquences (a) et (b) en raison de la dégénérescence du code génétique.

15 Les différentes séquences nucléotidiques de l'invention peuvent être d'origine artificielle ou non. Il peut s'agir de séquences génomiques, d'ADNc, d'ARN, de séquences hybrides ou de séquences synthétiques ou semi-synthétiques. Ces séquences peuvent être obtenues par exemple par criblage de banques d'ADN (banque d'ADNc, banque d'ADN génomique) au moyen de sondes élaborées sur la base de la séquence SEQ ID n° 1. De telles banques peuvent être préparées à partir de cellules
20 de différentes origines par des techniques classiques de biologie moléculaire connues de l'homme du métier. Les séquences nucléotidiques de l'invention peuvent également être préparées par synthèse chimique, notamment selon la méthode des phosphoramidites, ou encore par des méthodes mixtes incluant la modification chimique ou enzymatique de séquences obtenues par criblage de banques.

25 Les séquences nucléotidiques de l'invention peuvent être utilisées pour la production des polypeptides 5HT5b tels que définis précédemment. Dans ce cas, la partie codant pour ledit polypeptide est généralement placée sous le contrôle de signaux permettant son expression dans un hôte cellulaire. Le choix de ces signaux (promoteurs, terminateurs, etc) peut varier en fonction de l'hôte cellulaire utilisé. A
30 cet effet, les séquences nucléotidiques de l'invention peuvent faire partie d'un vecteur, qui peut être à répllication autonome ou intégratif. Plus particulièrement, des vecteurs à répllication autonome peuvent être préparés en utilisant des séquences à répllication autonome chez l'hôte choisi. S'agissant des vecteurs intégratifs, ceux-ci peuvent être

préparés par exemple en utilisant des séquences homologues à certaines régions du génome de l'hôte, permettant, par recombinaison homologue, l'intégration du vecteur. Les hôtes cellulaires utilisables pour la production des polypeptides 5HT5b de l'invention par voie recombinante sont aussi bien des hôtes eucaryotes que procaryotes. Parmi les hôtes eucaryotes qui conviennent, on peut citer les cellules animales, les levures, ou les champignons. En particulier, s'agissant de levures, on peut citer les levures du genre *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Schwanniomyces*, ou *Hansenula*. S'agissant de cellules animales, on peut citer les cellules COS, CHO, C127, NIH-3T3, etc. Parmi les champignons, on peut citer plus particulièrement *Aspergillus* ssp. ou *Trichoderma* ssp. Comme hôtes procaryotes, on préfère utiliser les bactéries suivantes *E.coli*, *Bacillus*, ou *Streptomyces*.

Les séquences nucléotidiques de la présente invention sont également utilisables dans le domaine pharmaceutique, soit pour la réalisation de séquences antisens utilisables dans le cadre d'une thérapie génique, soit encore pour la réalisation de sondes permettant la détection, par des expériences d'hybridation, de l'expression de récepteurs sérotoninergiques dans des échantillons biologiques et la mise en évidence d'anomalies génétiques (polymorphisme, mutations) ou d'expressions aberrantes.

L'inhibition de l'expression de certains gènes par des oligonucléotides antisens s'est avérée être une stratégie prometteuse dans le contrôle de l'activité d'un gène. Les oligonucléotides antisens sont des oligonucléotides de petite taille, complémentaires d'un ARNm, et de ce fait capables d'hybrider spécifiquement avec celui-ci, inhibant sa traduction en protéine. L'invention a ainsi pour objet les oligonucléotides antisens capables d'inhiber au moins partiellement la production de polypeptides 5HT5b tels que définis précédemment. L'invention concerne également les séquences antisens capables d'inhiber au moins partiellement la production de polypeptides 5HT5b. Les séquences antisens produisent dans la cellule cible des transcrits qui sont complémentaires d'ARNm cellulaires. De tels oligonucléotides ou séquences peuvent être constitués par tout ou partie des séquences nucléotidiques définies ci-avant. Il s'agit généralement de séquences ou de fragments de séquences complémentaires de séquences codant pour des peptides de l'invention. De tels oligonucléotides peuvent être obtenus à partir de la séquence SEQ ID n° 1, par fragmentation ou par synthèse chimique, etc.

Comme indiqué ci-dessus, l'invention permet également la réalisation de sondes nucléotidiques, synthétiques ou non, capables de s'hydrider avec les séquences nucléotidiques définies ci-avant qui codent pour des polypeptides 5HT5b de l'invention, ou avec les ARNm correspondant. De telles sondes peuvent être utilisées *in vitro* comme outil de diagnostic, pour la détection de l'expression d'un récepteur sérotoninergique 5HT5b, ou encore pour la mise en évidence d'anomalies génétiques (mauvais épissage, polymorphisme, mutations ponctuelles, etc). Compte tenu des activités multiples de la sérotonine, les sondes de l'invention peuvent ainsi permettre d'identifier des affections neurologique, cardiovasculaire ou psychiatrique comme étant liées aux récepteurs 5HT5b. Ces sondes peuvent également être utilisées pour la mise en évidence et l'isolement de séquences d'acides nucléiques homologues codant pour des polypeptides 5HT5b tels que définis précédemment, à partir d'autres sources cellulaires et préférentiellement de cellules d'origines humaines. Les sondes de l'invention comportent généralement au moins 10 bases, et elles peuvent comporter jusqu'à l'intégralité de la séquence SEQ ID n° 1 ou de son brin complémentaire. Préférentiellement, ces sondes sont, préalablement à leur utilisation, marquées. Pour cela, différentes techniques connues de l'homme du métier peuvent être employées (marquage radioactif, enzymatique, etc). Les conditions d'hybridation dans lesquelles ces sondes peuvent être utilisées sont indiquées dans les techniques générales de clonage ci-après ainsi que dans les exemples.

Un autre objet de l'invention concerne les cellules recombinées capables d'exprimer à leur surface un polypeptide 5HT5b tel que défini ci-avant. Ces cellules peuvent être obtenues par introduction d'une séquence nucléotidique telle que définie ci-dessus codant pour un polypeptide de l'invention, puis culture desdites cellules dans des conditions d'expression de ladite séquence.

Les cellules recombinées selon l'invention peuvent être aussi bien des cellules eucaryotes que procaryotes. Parmi les cellules eucaryotes qui conviennent, on peut citer les cellules animales, les levures, ou les champignons. En particulier, s'agissant de levures, on peut citer les levures du genre *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Schwanniomyces*, ou *Hansenula*. S'agissant de cellules animales, on peut citer les cellules COS, CHO, C127, NIH-3T3, etc. Parmi les champignons, on peut citer plus particulièrement *Aspergillus* ssp. ou *Trichoderma* ssp. Comme cellules procaryotes, on préfère utiliser les bactéries suivantes *E.coli*, *Bacillus*, ou *Streptomyces*. Les cellules ainsi obtenues peuvent être utilisées pour mesurer la capacité de différentes molécules à se comporter comme ligand ou comme

modulateur de l'activité des polypeptides de l'invention. Plus particulièrement, elles peuvent ainsi être utilisées dans un procédé de mise en évidence et d'isolement de ligands ou de modulateur de l'activité des polypeptides de l'invention, et, plus préférentiellement, d'agonistes et d'antagonistes de la sérotonine.

5 Un autre objet de l'invention concerne donc un procédé de mise en évidence et/ou d'isolement de ligands des polypeptides 5HT5b de l'invention, selon lequel on réalise les étapes suivantes :

- on met en contact une molécule ou un mélange contenant différentes molécules, éventuellement non-identifiées, avec une cellule recombinée telle que
10 décrite ci-dessus exprimant à sa surface un polypeptide de l'invention dans des conditions permettant l'interaction entre ledit polypeptide de l'invention et ladite molécule dans le cas où celle-ci posséderait une affinité pour ledit polypeptide, et,
- on détecte et/ou isole les molécules liées au dit polypeptide de l'invention.

15 Dans un mode particulier, ce procédé de l'invention est adapté à la mise en évidence et/ou l'isolement d'agonistes et d'antagonistes de la sérotonine pour les polypeptides 5HT5b.

Un autre objet de l'invention concerne un procédé de mise en évidence et/ou d'isolement de modulateurs des polypeptides 5HT5b de l'invention, selon lequel on réalise les étapes suivantes :

- 20 - on met en contact une molécule ou un mélange contenant différentes molécules, éventuellement non-identifiées, avec une cellule recombinée telle que décrite ci-dessus exprimant à sa surface un polypeptide de l'invention, en présence de 5HT, dans des conditions permettant l'interaction entre ledit polypeptide de l'invention et le 5HT, et,
25 - on détecte et/ou isole les molécules capables de moduler l'activité du 5HT sur ledit polypeptide de l'invention.

Un autre objet de l'invention concerne l'utilisation d'un ligand ou d'un modulateur identifié et/ou obtenu selon le procédé décrit ci-avant comme médicament. De tels ligands ou modulateurs peuvent en effet permettre de traiter
30 certaines affections neurologique, cardiovasculaire ou psychiatrique liées aux récepteurs 5HT5b.

L'invention concerne également tout médicament comprenant comme principe actif au moins une molécule agissant sur un polypeptide 5HT5b de

l'invention. Préférentiellement la molécule est un ligand ou un modulateur identifié et/ou isolé selon le procédé décrit précédemment.

D'autres avantages de la présente invention apparaîtront à la lecture des exemples qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

5 Légende des figures

Table 1 : Profil pharmacologique du récepteur 5HT5b. Les résultats correspondent à des expériences de compétition pour la liaison du [¹²⁵I]-LSD aux membranes des cellules Cos-7 exprimant le récepteur 5HT5b. Les valeurs d'IC₅₀ (correspondant à la concentration en ligand nécessaire pour déplacer 50 % du [¹²⁵I]-LSD lié) ont été
10 calculées expérimentalement et converties en K_i selon l'équation suivante : $K_i = IC_{50}/(1 + C/K_d)$ dans laquelle C est la concentration en [¹²⁵I]-LSD (150 pM) et K_d est la constante de dissociation du [¹²⁵I]-LSD. Les nombres entre parenthèses correspondent au nombre d'expériences indépendantes réalisées, chaque point étant réalisé en triple.

15 **Table 2** : Pourcentages d'homologie de séquence peptidique entre le récepteur 5HT5b (SEQ ID n° 2) et d'autres récepteurs de la famille des récepteurs couplés à des protéines G. Les homologies ont été calculées sur les séquences conservées : le domaine transmembranaire et ses boucles de connection.

Figure 1 : Courbe de saturation du [¹²⁵I]-LSD aux membranes des cellules Cos-7
20 exprimant le récepteur 5HT5b. Les membranes ont été incubées avec des concentrations de ligand allant de 50 pM à 1,25 nM, avec ou sans 10 µM de 5HT. La liaison spécifique est représentée. L'encart représente l'analyse en Scatchard des résultats.

Techniques générales de clonage

25 Les méthodes classiquement utilisées en biologie moléculaire telles que les extractions préparatives d'ADN plasmidique, la centrifugation d'ADN plasmidique en gradient de chlorure de césium, l'électrophorèse sur gels d'agarose ou d'acrylamide, la purification de fragments d'ADN par électroélution, les extractions de protéines au phénol ou au phénol-chloroforme, la précipitation d'ADN en milieu salin par de
30 l'éthanol ou de l'isopropanol, la transformation dans *Escherichia coli*, etc, sont bien connues de l'homme de métier et sont abondamment décrites dans la littérature

[Maniatis T. et al., "Molecular Cloning, a Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1982; Ausubel F.M. et al. (eds), "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, New York, 1987].

Les enzymes de restriction ont été fournies par New England Biolabs (Biolabs), Bethesda Research Laboratories (BRL) ou Amersham et sont utilisées selon les recommandations des fournisseurs.

Pour les ligatures, les fragments d'ADN sont séparés selon leur taille par électrophorèse en gels d'agarose ou d'acrylamide, extraits au phénol ou par un mélange phénol/chloroforme, précipités à l'éthanol puis incubés en présence de l'ADN ligase du phage T4 (Biolabs) selon les recommandations du fournisseur.

Le remplissage des extrémités 5' proéminentes est effectué par le fragment de Klenow de l'ADN Polymérase I d'*E. coli* (Biolabs) selon les spécifications du fournisseur. La destruction des extrémités 3' proéminentes est effectuée en présence de l'ADN Polymérase du phage T4 (Biolabs) utilisée selon les recommandations du fabricant. La destruction des extrémités 5' proéminentes est effectuée par un traitement ménagé par la nucléase S1.

La mutagénèse dirigée *in vitro* par oligodéoxynucléotides synthétiques est effectuée selon la méthode développée par Taylor et al. [Nucleic Acids Res. 13 (1985) 8749-8764] en utilisant le kit distribué par Amersham.

L'amplification enzymatique de fragments d'ADN par la technique dite de PCR [Polymérase-catalyzed Chain Reaction, Saiki R.K. et al., Science 230 (1985) 1350-1354 ; Mullis K.B. et Faloona F.A., Meth. Enzym. 155 (1987) 335-350] est effectuée en utilisant un "DNA thermal cycler" (Perkin Elmer Cetus) selon les spécifications du fabricant.

La vérification des séquences nucléotidiques est effectuée par la méthode développée par Sanger et al. [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74 (1977) 5463-5467] en utilisant le kit distribué par Amersham.

Pour les expériences d'hybridation, les conditions de stringence normales sont généralement les suivantes : hybridation : 3 x SCC en présence de 5 x Denhart's à 65°C ; lavage : 0,5 x SSC à 65°C.

1. Isolement du récepteur 5HT5b

Les comparaisons de séquences entre les différents récepteurs sérotoninergiques connus font apparaître une certaine conservation, particulièrement dans certaines régions transmembranaires potentielles telles que les domaines III et VI.

Dans le but de mettre en évidence et d'isoler un nouveau récepteur, trois oligonucléotides dégénérés correspondant à ces deux régions ont été préparés, puis utilisés dans une série de réactions de PCR sur une préparation d'ARN de cerveau de souris. La séquence des oligonucléotides dégénérés est la suivante :

5 Oligonucléotide (i)

AGAACTAGTGGATCCAA(A/G)AA(A/G/C/T)GG(A/G/C/T)A(A/G)CCA(A/G)CA

Oligonucléotide (ii)

CTTGATATCGAATTCGA(T/C)(A/G)T(A/G/C/T)CT(A/G/C/T)TG(C/T)TG(C/T)A
C

10 Oligonucléotide (iii)

GGTATCGATAAGCTTAT(C/T/A)GC(C/T)CT(A/G/C/T)GA(C/T)(C/A)G(A/G/C/
T)TA

Les réactions de PCR ont été réalisées de la manière suivante : 5 µg d'ARN de cerveau de souris adulte ont été soumis à une réaction de transcription inverse en
15 présence de 500 ng d'oligonucléotide (i) et de 200 unités de transcriptase inverse MMLV (BRL). La moitié du produit de cette réaction a ensuite été soumise à 30 cycles d'amplification en présence de 5 unités de polymérase Taq (Cetus) et de 1 µg d'oligonucléotide (i) et d'oligonucléotide (ii). 1/20e du produit de cette réaction a ensuite été soumis à 30 cycles d'amplification supplémentaires en présence des
20 oligonucléotides (i) et (iii). Les produits ainsi obtenus ont été digérés avec les enzymes BamHI et HindIII, insérés aux sites correspondant du plasmide Bluescript (Stratagène), et séquencés. L'un des fragments ainsi obtenus, présentant une certaine homologie avec les récepteurs sérotoninergiques, a été marqué par "random priming" (Feinberg et Vogelstein, Analytical Biochemistry 132 (1984) 6) et utilisé comme
25 sonde pour cribler une banque de cDNA de cerveau de souris construite dans le phage UniZap (Stratagène). Parmi les phages positifs obtenus, l'un d'entre-eux, dénommé λNS et porté par le plasmide pNS, contenait un insert de 2,1 kb. Ce phage a été isolé, et son insert a ensuite été introduit dans le plasmide Bluescript. La séquence de ce fragment a été déterminée sur les 2 brins en utilisant la technique des
30 dideoxynucléotides au moyen d'oligonucléotides synthétiques.

La séquence ainsi obtenue correspond à la séquence SEQ ID n° 1. Elle montre que l'ADNc isolé porte une phase de lecture ouverte de 370 acides aminés. Par ailleurs, l'analyse d'hydrophobicité montre que cette protéine porte sept domaines hydrophobes, une particularité rencontrée chez les membres de la famille des récepteurs couplés à des protéines G. L'extrémité N-terminale contient par ailleurs 1 site de N-glycosylation, et le domaine cytoplasmique présumé contient les sites consensus de phosphorylation par les protéines kinases C et A.

Un clone génomique codant pour le récepteur 5HT5b a également été isolé, par criblage d'une banque génomique au moyen de la séquence SEQ ID n° 1 comme sonde. La banque avait été obtenue par digestion partielle par Sau3A de l'ADN génomique de cellules souches d'embryon de souris, puis insertion dans le phage lambda EMBL3.

Les fragments obtenus ont été sous clonés dans le plasmide Bluescript et partiellement séquencés. L'analyse de ces séquences révèle la présence d'un intron, localisé au milieu de la 3ème boucle cytoplasmique.

2. Etude d'homologies de séquence

La séquence du récepteur 5HT5b isolé ci-dessus a été comparée avec les séquences des récepteurs couplés à des protéines G suivants : 5HT1B, 5HT1D, 5HT5A, 5HT1A, 5HT-dro2A, 5HT-dro1, $\alpha 2$, D2, B1, D1, H2, 5HT1C et 5HT2. Ces expériences ont révélé une certaine homologie dans le domaine transmembranaire potentiel et dans certaines boucles, mais aucune homologie dans les régions terminales ni dans la troisième boucle cytoplasmique. La table 2 donne les % d'homologie au niveau des régions conservées.

3. Expression du récepteur 5HT5b dans les cellules Cos-7 et caractérisation pharmacologique

Le fragment d'ADNc isolé dans l'exemple 1 a été inséré dans un vecteur d'expression eucaryote, qui a été utilisé pour transfecter des cellules Cos-7. Les membranes des cellules transfectées obtenues ont ensuite été préparées et testées pour leur capacité à lier certains ligands sérotoninergiques marqués.

L'ADNc de 2,1 kb codant pour le récepteur 5HT5b a été isolé à partir du plasmide pNS sous forme d'un fragment EcoRI-XhoI, puis inséré aux sites

correspondants du vecteur p513. Le vecteur p513 dérive du vecteur pSG5 [Green et al., Nucl. Acids Res. 16 (1988) 369] par addition d'un multisite de clonage. Le vecteur recombinant ainsi obtenu désigné p513NS a ensuite été utilisé (20 µg par plaque de 10 cm) pour transfecter les cellules Cos-7 en présence de phosphate de calcium.

48 heures après la transfection, les cellules recombinantes sont récoltées et les membranes sont préparées selon la technique décrite par Amlaiky et Caron [J. Biol. Chem. 260 (1985) 1983]. Des expériences de liaison à saturation et de compétition ont ensuite été réalisées sur ces membranes en présence de différents ligands radiomarqués (cf. Table 1). Pour cela, les échantillons de membrane (10-20 µg de protéines) ont été incubés 10 minutes à 37°C en présence du ligand dans un volume final de 250 µl de tampon Tris-HCl 50 mM (pH 7,4). La réaction est ensuite stopée par filtration sous vide sur filtres en fibre de verre Whatman GF/C, et rinçage 4 fois avec 4 ml de tampon Tris-HCl 50 mM (pH 7,4). La liaison non-spécifique a été déterminée en présence de 10 µM de 5HT. La radioactivité a été mesurée avec un compteur γ.

Les résultats obtenus montrent que le [¹²⁵I]-LSD présente un site de liaison saturable avec un K_d = 470 pM et un B_{max} = 170 fmol/mg de protéines membranaires (figure 1). Dans une expérience contrôle, il a par ailleurs été montré que le [¹²⁵I]-LSD ne liait pas les cellules Cos-7 transfectées par le plasmide p513.

Pour déterminer le profil pharmacologique de ce récepteur, le [¹²⁵I]-LSD lié aux membranes a été déplacé en présence de différentes drogues sérotoninergiques (table 1). Ces différentes drogues montrent l'ordre d'efficacité de déplacement suivant : ergotamine > 5-CT > methysergide > 5HT > RU24969 > 8-OH-DPAT > yohimbine > bufotenine (table 1). La kétansérine, le propanolol (-), le sumatriptan, la dopamine et la norépinéphrine sont inactifs.

4. Recherche de séquences homologues dans d'autres tissus

La séquence nucléotidique SEQ ID n° 1 a ensuite été utilisée pour la mise en évidence de séquences homologues à partir d'autres tissus par hybridation *in situ*.

Les expériences d'hybridation *in situ* ont été réalisées sur des sections cryostatées de cerveau de souris adulte (8 semaines environ) selon la technique décrite par Hafen et al. [EMBO J. 2 (1983) 617]. La sonde utilisée pour ces

expériences est un ARN simple brin obtenu par transcription en présence de polymérase T3, de [³⁵S]-CTP en utilisant comme matrice le plasmide pNS linéarisé par Xho1.

Cette étude a permis de mettre en évidence des séquences homologues selon l'invention dans l'hippocampe (région CA1), le corps d'habenula et le raphé dorsal.

5. Isolement du récepteur humain

Selon la méthodologie décrite en 4. ci-dessus, le récepteur 5HT5b humain a été cloné.

Pour cela, une banque d'ADN génomique humain a été préparée à partir de placenta, par digestion partielle par l'enzyme Mbo1, séparation sur gradients de sels, et sous clonage dans le vecteur Lamda GEM 12 linéarisé par BamHI (bactérie hôte: TAP 90).

La banque ainsi obtenue a ensuite été criblée au moyen de la séquence SEQ ID n° 1. Les fragments de DNA qui hybrident avec cette sonde ont été isolés, sous clonés dans un plasmide Bluescript, amplifiés, puis séquencés dans les deux sens selon la technique dideoxynucleotide.

La séquence obtenue est présentée sur la séquence SEQ ID n° 3.

Il est entendu que les mêmes expériences peuvent être répétées en utilisant d'autres tissus, et notamment des tissus d'origine humaine, d'autres sondes et d'autres techniques (PCR, hybridation en Northern blot. Par ailleurs, les séquences homologues mises en évidence lors de ces expériences peuvent évidemment être ensuite isolées et/ou amplifiées par les techniques classiques de biologie moléculaire.

TABLE 1

LIGAND	pKi 5HT5b Cellules Cos-7
5-HT	6.6 (3)
5-CT	7.4 (3)
RU 24969	6.4 (2)
TFMPP	5.4 (2)
8-OHDPAT	6.4 (2)
Sumatriptan	5.1 (3)
Bufotenine	5.8 (2)
Methysergide	6.9 (2)
Ergotamine	8.5 (2)
2-Bromo LSD	
Methiothepin	7.8 (3)
Yohimbine	6.0 (2)
(±)Pindolol	
(-)Propanolol	5.2 (2)
Ketanserin	5.8 (2)
Sipiperone	
Dopamine	<5 (2)
(-)Norepin	<5 (2)

TABLE 2

5HT5B souris	100
5HT5A souris	77
5HT1B β souris	37
5HT1D α humain	37
5HT1E α souris	37
5HT1E β souris	36
5HT1A humain	36
5HT-dro2A	41
5HT-dro1	38
α 2 humain	34
D2 souris	36
H2 chien	26
β 1 humain	30
β 2 souris	29
D1 humain	31
5HT1C souris	30
5HT2 souris	26

LISTE DE SEQUENCES

(I) INFORMATION GENERALE:

5

(i) DEPOSANT:

(A) NOM: INSERM

(B) RUE: 101, rue de Tolbiac

(C) VILLE: PARIS

10

(E) PAYS: FRANCE

(F) CODE POSTAL: 75654

(ii) TITRE DE L' INVENTION: NOUVEAUX POLYPEPTIDES AYANT UNE ACTIVITE DE
RECEPTEURS SEROTONINERGIQUES, ACIDES NUCLEIQUES CODANT POUR CES
POLYPEPTIDES ET UTILISATIONS.

15

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 3

(iv) FORME LISIBLE PAR ORDINATEUR:

20

(A) TYPE DE SUPPORT: Tape

(B) ORDINATEUR: IBM PC compatible

(C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS

(D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (OEB)

25

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

30

(A) LONGUEUR: 2036 paires de bases

(B) TYPE: acide nucléique

(C) NOMBRE DE BRINS: double

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

35

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

40

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: SOURIS

(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:

45

(A) NOM/CLE: CDS

(B) EMBLEMMENT: 312..1424

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

50

GAATTCGGCA CGAGCAGGCA CCAGTCCCCA ATCCTCTGCA GTCGGTTACC CTGAAGACCA 60

CAAAGGGACT GAGAGATTGA TGCCTGGGC AAAGCTGGAC TAAGGAGTCT CATCTGGAAA 120

AGAGCGTCCA TGAAAAAGC CAAAAGAAGC GCCAAAAGGA GGCTGCAGTT TGGAAAAGGG 180

15

	ACAAGGGTGG	CGCGGTTTGG	ACATCTTTTT	GCGTAGCTGG	GCGCGCGGAG	TGCCTCTCTT	240										
	GCTTCGCCAC	CTATCCACAG	TTCATGCAAC	CACGGGCACA	TCTCCTGCCC	CAGAGCCCCA	300										
5	GTCCCTGAAT	A	ATG	GAA	GTT	TCT	AAC	CTC	TCA	GGC	GCC	ACT	CCC	GGC	CTT	350	
		Met	Glu	Val	Ser	Asn	Leu	Ser	Gly	Ala	Thr	Pro	Gly	Leu			
		1				5					10						
10	GCC	TTT	CCT	CCG	GGA	CCT	GAG	AGC	TGC	AGT	GAC	AGC	CCA	AGT	TCC	GGC	398
	Ala	Phe	Pro	Pro	Gly	Pro	Glu	Ser	Cys	Ser	Asp	Ser	Pro	Ser	Ser	Gly	
		15					20					25					
15	AGG	AGC	ATG	GGA	TCC	ACC	CCA	GGT	GGG	CTC	ATC	TTG	CCC	GGC	CGC	GAG	446
	Arg	Ser	Met	Gly	Ser	Thr	Pro	Gly	Gly	Leu	Ile	Leu	Pro	Gly	Arg	Glu	
		30				35					40					45	
20	CCG	CCC	TTC	TCT	GCT	TTC	ACC	GTG	CTT	GTG	GTG	ACT	CTA	CTG	GTG	TTG	494
	Pro	Pro	Phe	Ser	Ala	Phe	Thr	Val	Leu	Val	Val	Thr	Leu	Leu	Val	Leu	
					50					55					60		
25	CTG	ATC	GCT	GCC	ACT	TTC	TTA	TGG	AAT	CTG	CTA	GTT	CTG	GTG	ACT	ATC	542
	Leu	Ile	Ala	Ala	Thr	Phe	Leu	Trp	Asn	Leu	Leu	Val	Leu	Val	Thr	Ile	
				65					70					75			
30	CTG	CGC	GTC	CGC	GCC	TTC	CAC	CGC	GTG	CCA	CAT	AAC	TTG	GTG	GCC	TCG	590
	Leu	Arg	Val	Arg	Ala	Phe	His	Arg	Val	Pro	His	Asn	Leu	Val	Ala	Ser	
			80					85					90				
35	ACA	GCC	GTC	TCG	GAT	GTC	CTG	GTG	GCG	GTT	CTG	GTG	ATG	CCT	CTG	AGC	638
	Thr	Ala	Val	Ser	Asp	Val	Leu	Val	Ala	Val	Leu	Val	Met	Pro	Leu	Ser	
		95					100					105					
40	CTG	GTG	AGC	GAG	TTG	TCC	GCT	GGG	CGA	CGT	TGG	CAG	CTA	GGC	AGG	AGT	686
	Leu	Val	Ser	Glu	Leu	Ser	Ala	Gly	Arg	Arg	Trp	Gln	Leu	Gly	Arg	Ser	
		110				115					120					125	
45	CTG	TGC	CAC	GTG	TGG	ATC	TCC	TTC	GAC	GTG	TTG	TGC	TGC	ACC	GCC	AGC	734
	Leu	Cys	His	Val	Trp	Ile	Ser	Phe	Asp	Val	Leu	Cys	Cys	Thr	Ala	Ser	
				130						135					140		
50	ATC	TGG	AAC	GTG	GCG	GCC	ATC	GCC	CTG	GAT	CGC	TAC	TGG	ACT	ATC	ACG	782
	Ile	Trp	Asn	Val	Ala	Ala	Ile	Ala	Leu	Asp	Arg	Tyr	Trp	Thr	Ile	Thr	
				145					150					155			
55	CGC	CAC	CTG	CAG	TAC	ACG	CTG	CGC	ACC	CGG	AGC	CGT	GCT	TCT	GCG	CTC	830
	Arg	His	Leu	Gln	Tyr	Thr	Leu	Arg	Thr	Arg	Ser	Arg	Ala	Ser	Ala	Leu	
			160					165					170				
60	ATG	ATC	GCG	ATC	ACC	TGG	GCA	CTG	TCC	GCG	CTC	ATT	GCT	CTC	GCC	CCG	878
	Met	Ile	Ala	Ile	Thr	Trp	Ala	Leu	Ser	Ala	Leu	Ile	Ala	Leu	Ala	Pro	
		175					180					185					
65	CTG	CTT	TTT	GGC	TGG	GGC	GAA	GCC	TAT	GAT	GCT	CGG	CTG	CAG	CGT	TGC	926
	Leu	Leu	Phe	Gly	Trp	Gly	Glu	Ala	Tyr	Asp	Ala	Arg	Leu	Gln	Arg	Cys	
		190				195				200						205	
70	CAG	GTG	AGC	CAG	GAG	CCC	TCC	TAT	GCT	GTC	TTC	TCC	ACC	TGC	GGA	GCC	974
	Gln	Val	Ser	Gln	Glu	Pro	Ser	Tyr	Ala	Val	Phe	Ser	Thr	Cys	Gly	Ala	
				210						215					220		
75	TTC	TAC	CTG	CCT	CTA	GCG	GTG	GTG	CTC	TTC	GTC	TAC	TGG	AAA	ATA	TAC	1022
	Phe	Tyr	Leu	Pro	Leu	Ala	Val	Val	Leu	Phe	Val	Tyr	Trp	Lys	Ile	Tyr	

	225	230	235	
5	AAA GCC GCC AAG TTT CGA TTC GGT CGC AGA CGG CGG GCG GTG GTA CCG Lys Ala Ala Lys Phe Arg Phe Gly Arg Arg Arg Arg Ala Val Val Pro 240 245 250	1070		
10	CTT CCT GCC ACC ACG CAG GCA AAG GAA GCA CCT CCG GAG TCT GAG ATG Leu Pro Ala Thr Thr Gln Ala Lys Glu Ala Pro Pro Glu Ser Glu Met 255 260 265	1118		
15	GTG TTC ACA GCC CGT CGC CGA GCA ACA GTG ACC TTC CAG ACA AGC GGA Val Phe Thr Ala Arg Arg Arg Ala Thr Val Thr Phe Gln Thr Ser Gly 270 275 280 285	1166		
20	GAC TCC TGG CGG GAG CAG AAG GAG AAG CGG GCA GCC ATG ATG GTC GGG Asp Ser Trp Arg Glu Gln Lys Glu Lys Arg Ala Ala Met Met Val Gly 290 295 300	1214		
25	ATC TTG ATT GGC GTG TTT GTG CTT TGT TGG ATC CCC TTC TTC CTG ACG Ile Leu Ile Gly Val Phe Val Leu Cys Trp Ile Pro Phe Phe Leu Thr 305 310 315	1262		
30	GAG CTC ATC AGC CCG CTC TGT GCC TGC AGC CTG CCA CCC ATC TGG AAA Glu Leu Ile Ser Pro Leu Cys Ala Cys Ser Leu Pro Pro Ile Trp Lys 320 325 330	1310		
35	AGC ATA TTC CTG TGG CTT GGA TAT TCC AAT TCG TTC TTC AAC CCC TTG Ser Ile Phe Leu Trp Leu Gly Tyr Ser Asn Ser Phe Phe Asn Pro Leu 335 340 345	1358		
40	ATT TAC ACT GCC TTT AAT AAG AAT TAC AAC AAT GCC TTC AAG AGC CTC Ile Tyr Thr Ala Phe Asn Lys Asn Tyr Asn Asn Ala Phe Lys Ser Leu 350 355 360 365	1406		
45	TTT ACT AAG CAG AGA TAAGAAGGGC TGGGGAGAGA AAAGGGAAGA CCTGGGAAGA Phe Thr Lys Gln Arg 370	1461		
50	GAAAGGGGAC CTGTGATCCT CATTTCACCC GAGACCTTCT CCCCACCACC CACGGCCCCGA TGATGACACT CCAAAAGTCA TACCATTGGC CCTGGACGTT GAAGAGTTCT CATGGGGGTT GGCAACTGTT TGCCAAACAC ACCCATGCCT TCTACAGAAG GACGTGACAG ACATTATTAG TGAATTGTGC TCCATTTCTG CACTAGGCAG AAACCCTGCC AAACACTTTC AGGATAGATT TTAGGTATTG GTGAGCATTG GTTAGACCTC ACATGTGACA AAGTTGATTT GCTTTTCCAT TATTTAGTAC TGTGTCCTCT CTCAGGAGTT TCCTGAGTCT GTCTCCTTGA CACAGCCTCT CCTCTATCCC TTATCCATCA GAGGAGTTTC CTTTTCTTAG CCTCCTATAC AACCTCCACA GGACAAATGAT TCTCAGCTTA GAAGCGGGCC TCACCTGAAG CTTTGATAAA ACGTGTCCCA CGCAGGTGTC TTCAAGATGG CTCAGTAGGT GAAGGCACCT GCCCCTGAGC CTGGTGGCCCT GCTTTTGATG GAGACACACG TAATGGAAGG AAAGG	1521 1581 1641 1701 1761 1821 1881 1941 2001 2036		
60	(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 2:			
	(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:			

(A) LONGUEUR: 370 acides aminés

(B) TYPE: acide aminé

(D) CONFIGURATION: linéaire

5 (ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

10	Met	Glu	Val	Ser	Asn	Leu	Ser	Gly	Ala	Thr	Pro	Gly	Leu	Ala	Phe	Pro
	1				5					10					15	
	Pro	Gly	Pro	Glu	Ser	Cys	Ser	Asp	Ser	Pro	Ser	Ser	Gly	Arg	Ser	Met
				20					25					30		
15	Gly	Ser	Thr	Pro	Gly	Gly	Leu	Ile	Leu	Pro	Gly	Arg	Glu	Pro	Pro	Phe
			35					40					45			
	Ser	Ala	Phe	Thr	Val	Leu	Val	Val	Thr	Leu	Leu	Val	Leu	Leu	Ile	Ala
		50					55					60				
20	Ala	Thr	Phe	Leu	Trp	Asn	Leu	Leu	Val	Leu	Val	Thr	Ile	Leu	Arg	Val
	65					70					75					80
	Arg	Ala	Phe	His	Arg	Val	Pro	His	Asn	Leu	Val	Ala	Ser	Thr	Ala	Val
25					85					90					95	
	Ser	Asp	Val	Leu	Val	Ala	Val	Leu	Val	Met	Pro	Leu	Ser	Leu	Val	Ser
				100					105					110		
30	Glu	Leu	Ser	Ala	Gly	Arg	Arg	Trp	Gln	Leu	Gly	Arg	Ser	Leu	Cys	His
			115					120					125			
	Val	Trp	Ile	Ser	Phe	Asp	Val	Leu	Cys	Cys	Thr	Ala	Ser	Ile	Trp	Asn
		130					135					140				
35	Val	Ala	Ala	Ile	Ala	Leu	Asp	Arg	Tyr	Trp	Thr	Ile	Thr	Arg	His	Leu
	145					150					155					160
	Gln	Tyr	Thr	Leu	Arg	Thr	Arg	Ser	Arg	Ala	Ser	Ala	Leu	Met	Ile	Ala
40					165					170					175	
	Ile	Thr	Trp	Ala	Leu	Ser	Ala	Leu	Ile	Ala	Leu	Ala	Pro	Leu	Leu	Phe
				180					185					190		
45	Gly	Trp	Gly	Glu	Ala	Tyr	Asp	Ala	Arg	Leu	Gln	Arg	Cys	Gln	Val	Ser
			195					200					205			
	Gln	Glu	Pro	Ser	Tyr	Ala	Val	Phe	Ser	Thr	Cys	Gly	Ala	Phe	Tyr	Leu
		210					215					220				
50	Pro	Leu	Ala	Val	Val	Leu	Phe	Val	Tyr	Trp	Lys	Ile	Tyr	Lys	Ala	Ala
	225					230					235					240
	Lys	Phe	Arg	Phe	Gly	Arg	Arg	Arg	Arg	Ala	Val	Val	Pro	Leu	Pro	Ala
55					245					250					255	
	Thr	Thr	Gln	Ala	Lys	Glu	Ala	Pro	Pro	Glu	Ser	Glu	Met	Val	Phe	Thr
				260					265					270		
60	Ala	Arg	Arg	Arg	Ala	Thr	Val	Thr	Phe	Gln	Thr	Ser	Gly	Asp	Ser	Trp
				275				280					285			

Arg Glu Gln Lys Glu Lys Arg Ala Ala Met Met Val Gly Ile Leu Ile
290 295 300
5 Gly Val Phe Val Leu Cys Trp Ile Pro Phe Phe Leu Thr Glu Leu Ile
305 310 315 320
Ser Pro Leu Cys Ala Cys Ser Leu Pro Pro Ile Trp Lys Ser Ile Phe
325 330 335
10 Leu Trp Leu Gly Tyr Ser Asn Ser Phe Phe Asn Pro Leu Ile Tyr Thr
340 345 350
Ala Phe Asn Lys Asn Tyr Asn Asn Ala Phe Lys Ser Leu Phe Thr Lys
355 360 365
15 Gln Arg
370

20 (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 3:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(B) TYPE: acide nucléique

(C) NOMBRE DE BRINS: double

25 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNg

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

30 (vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: Homo Sapiens

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

35 VKEAPDEAEVVFTAHCATVSFQVSGDSWREQKERRAAMMVGILIGVFLCWIP
FFLTELISPLCACSLPPIWKSIFLWLGYSNSFFNPLYTAFNKNYNNAFKSLFTKQ
R*

GTAAAGGAAGCACCTGATGAGGCTGAAGTGGTGTTCACGGCACATTGCAAAGCAACGGTG
TCCTTCCAGGTGAGCGGGGACTCCTGGCGGGAGCAGAAGGAGAGGCGAGCAGCCATGATG
GTGGGGATTCTGATTGGCGTGTTTGTGCTGTGCTGGATCCCCTTCTTCTGACGGAACCTC
ATCAGCCCCTCTGTGCCTGCAGCCTGCCCCCATCTGGAAAAGCATATTTCTGTGGCTT
GGCTACTCCAATTCTTTCTTCAACCCCTGATTACACAGCTTTTAACAAGAAGTACAAC
AATGCCTTCAAGAGCCTCTTTACTAAGCAGAGATGA

REVENDICATIONS

1. Polypeptide comprenant tout ou partie de la séquence peptidique SEQ ID n° 2 ou d'un dérivé de celle-ci.
2. Polypeptide selon la revendication 1 caractérisé en ce qu'il possède la
5 capacité de lier la sérotonine.
3. Polypeptide selon la revendication 2 caractérisé en ce qu'il possède une activité de récepteur sérotoninergique.
4. Polypeptide selon l'une des revendications 1 à 3 caractérisé en ce qu'il
peut être reconnu par des anticorps reconnaissant la séquence peptidique SEQ ID n° 2
10 complète.
5. Polypeptide selon l'une des revendications 1 à 4 caractérisé en ce qu'il comprend toute la séquence peptidique SEQ ID n° 2 ou SEQ ID n° 3.
6. Séquence nucléotidique codant pour un polypeptide selon l'une des revendications 1 à 5.
7. Séquence selon la revendication 6 caractérisée en ce qu'elle est choisie
15 parmi :
 - (a) tout ou partie de la séquence nucléotidique SEQ ID n° 1 ou de son brin complémentaire,
 - (b) toute séquence hybridant avec une séquence (a) et codant pour un
20 polypeptide selon l'une des revendications 1 à 5, et,
 - (c) les séquences dérivées des séquences (a) et (b) en raison de la dégénérescence du code génétique.
8. Séquence selon la revendication 7 caractérisée en ce qu'elle est choisie
parmi les séquences génomiques, d'ADNc, d'ARN, les séquences hybrides ou les
25 séquences synthétiques ou semi-synthétiques.
9. Séquence selon l'une des revendications 6 à 8 caractérisée en ce que la partie codant pour ledit polypeptide est placée sous le contrôle de signaux permettant son expression dans un hôte cellulaire.

10. Séquence antisens capable d'inhiber au moins partiellement la production de polypeptides selon l'une des revendications 1 à 5.

11. Séquence selon la revendication 10 caractérisée en ce qu'elle est constituée par tout ou partie d'une séquence nucléotidique selon la revendication 7.

5 12. Sonde nucléotidique capable de s'hydrider avec une séquence selon la revendication 6 ou avec l'ARNm correspondant.

13 Sonde selon la revendication 12 caractérisée en ce qu'elle comporte au moins 10 bases.

10 14. Sonde selon la revendication 13 caractérisée en ce qu'elle comporte l'intégralité de la séquence SEQ ID n° 1 ou de son brin complémentaire.

15 15. Utilisation d'une sonde selon l'une des revendications 12 à 13 pour la détection de l'expression d'un récepteur sérotoninergique 5HT5b; ou pour la mise en évidence d'anomalies génétiques (mauvais épissage, polymorphisme, mutations ponctuelles, etc); ou pour identifier des affections neurologique, cardiovasculaire ou psychiatrique comme étant liées aux récepteurs 5HT5b; ou encore pour la mise en évidence et l'isolement de séquences d'acides nucléiques homologues codant pour des polypeptides 5HT5b.

16. Cellule recombinée capable d'exprimer à sa surface un polypeptide selon l'une des revendications 1 à 5.

20 17. Cellule selon la revendication 16 caractérisée en ce qu'elle est choisie parmi les cellules eucaryotes ou procaryotes.

18. Procédé de mise en évidence et/ou d'isolement de ligands des polypeptides tels que définis dans les revendications 1 à 5, caractérisé en ce que l'on réalise les étapes suivantes :

25 - on met en contact une molécule ou un mélange contenant différentes molécules, éventuellement non-identifiées, avec une cellule recombinée selon la revendication 16 exprimant à sa surface un polypeptide tel que défini dans les revendications 1 à 5 dans des conditions permettant l'interaction entre ledit polypeptide et ladite molécule dans le cas où celle-ci posséderait une affinité pour
30 ledit polypeptide, et,

- on détecte et/ou isole les molécules liées au dit polypeptide.

19. Procédé selon la revendication 18 pour la mise en évidence et/ou l'isolement d'agonistes ou d'antagonistes de la sérotonine.

20. Procédé de mise en évidence et/ou d'isolement de modulateurs des polypeptides tels que définis dans les revendications 1 à 5, caractérisé en ce que l'on réalise les étapes suivantes :

- on met en contact une molécule ou un mélange contenant différentes molécules, éventuellement non-identifiées, avec une cellule recombinée selon la revendication 16 exprimant à sa surface un polypeptide tel que défini dans les revendications 1 à 5, en présence de 5HT, dans des conditions permettant l'interaction entre ledit polypeptide et le 5HT, et,

- on détecte et/ou isole les molécules capables de moduler l'activité du 5HT sur ledit polypeptide.

21. Ligand ou modulateur d'un polypeptide tel que défini dans les revendications 1 à 5, susceptible d'être obtenu selon les procédés des revendications 18 à 20.

22. Utilisation d'un ligand ou modulateur identifié et/ou obtenu selon les procédés des revendications 18 à 20 pour la préparation d'un médicament destiné au traitement des affections neurologique, cardiovasculaire ou psychiatrique liées aux récepteurs 5HT5b.

23. Médicament comprenant comme principe actif au moins une molécule agissant sur un polypeptide selon l'une des revendications 1 à 5.

24. Médicament selon la revendication 23 caractérisé en ce que la molécule est un ligand ou un modulateur identifié et/ou isolé selon le procédé des revendications 18 à 20.

1/1

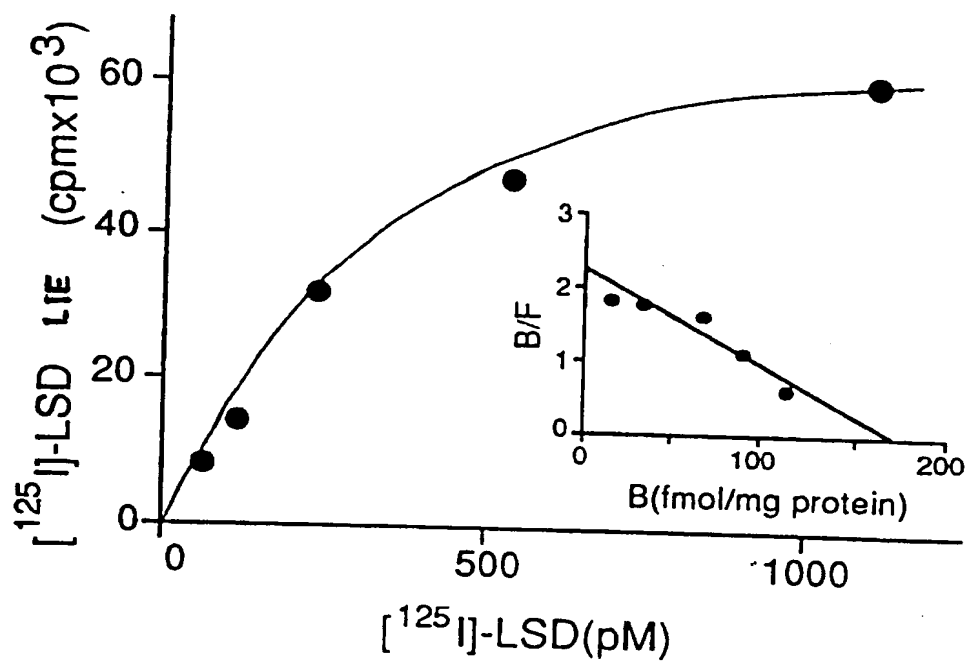


Figure 1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 94/00136

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 5 C12N15/12 C07K13/00 C07H21/00 C12Q1/68 G01N33/68
A61K31/00 C12N5/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 5 C07K A61K G01N C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SOCIETY FOR NEUROSCIENCE ABSTRACTS vol. 18, no. 1-2 , 1992 page 464 M. ERLANDER ET AL 'A novel 5-HT receptor subfamily highly enriched in the hippocampus' see the abstract 198.12 ---	1-24
X	SOCIETY FOR NEUROSCIENCE ABSTRACTS vol. 18, no. 1-2 , 1992 page 464 T. LOVENBERG ET AL 'Cloning and functional expression of a novel rat 5HT1 like receptor' see the abstract 198.13 --- -/--	1-24

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☐ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- * "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- * "E" earlier document but published on or after the international filing date
- * "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- * "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- * "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

* "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

* "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

* "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

* "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

15 June 1994

Date of mailing of the international search report

30. 06. 94

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Van der Schaal, C

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SOCIETY FOR NEUROSCIENCE ABSTRACTS vol. 18, no. 1-2, 1992 page 212 N. AMLAIKY ET AL 'The mouse 5HT5 and 5HT6 receptors' see the abstract 100-12 ---	1-24
X	EMBO JOURNAL. vol. 11, no. 13, 1992, EYNSHAM, OXFORD GB pages 4779 - 4786 J-L PLASSAT ET AL 'The mouse 5HT5 receptor reveals a remarkable heterogeneity within the 5HT1D receptor family' see the whole document ---	1,6-8, 10-13, 21-24
X	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA. vol. 89, April 1992, WASHINGTON US pages 3020 - 3024 L.MAROTEAUX ET AL 'Mouse 5HT1B serotonin receptor: Cloning, functional expression, and localization in motor control centres' see the whole document ---	1,7,8, 10-13, 21-24
P,X	MOLECULAR PHARMACOLOGY vol. 43, March 1993 pages 313 - 319 H. MATTHES ET AL 'Mouse 5-hydroxytryptamine-5A and 5-hydroxytryptamine-5B receptors define a new family of serotonin receptors' see the whole document ---	1-24
P,X	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA. vol. 90, April 1993, WASHINGTON US pages 3452 - 3456 M. ERLANDER ET AL 'Two members of a distinct subfamily of 5-hydroxytryptamine receptors differentially expressed in rat brain' see the whole document ---	1-24
A	TIPS vol. 13, April 1992 pages 160 - 165 R. HEN 'Of mice and flies: commonalities among 5-HT receptors' -----	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

F. Code Internationale No
PCT/FR 94/00136

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 5 C12N15/12 C07K13/00 C07H21/00 C12Q1/68 G01N33/68
A61K31/00 C12N5/10

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 5 C07K A61K G01N C12Q

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	SOCIETY FOR NEUROSCIENCE ABSTRACTS vol. 18, no. 1-2, 1992 page 464 M. ERLANDER ET AL 'A novel 5-HT receptor subfamily highly enriched in the hippocampus' voir le résumé 198.12 ---	1-24
X	SOCIETY FOR NEUROSCIENCE ABSTRACTS vol. 18, no. 1-2, 1992 page 464 T. LOVENBERG ET AL 'Cloning and functional expression of a novel rat 5HT1 like receptor' voir le résumé 198.13 ---	1-24
	-/--	

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☐ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

A document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

E document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

L document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

O document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

P document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

T document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

X document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

Y document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

Z document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

15 Juin 1994

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

30.06.94

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Van der Schaal, C

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>SOCIETY FOR NEUROSCIENCE ABSTRACTS vol. 18, no. 1-2 , 1992 page 212 N. AMLAIKY ET AL 'The mouse 5HT5 and 5HT6 receptors' voir le résumé 100.12 ---</p>	1-24
X	<p>EMBO JOURNAL. vol. 11, no. 13 , 1992 , EYNSHAM, OXFORD GB pages 4779 - 4786 J-L PLASSAT ET AL 'The mouse 5HT5 receptor reveals a remarkable heterogeneity within the 5HT1D receptor family' voir le document en entier ---</p>	1,6-8, 10-13, 21-24
X	<p>PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA. vol. 89 , Avril 1992 , WASHINGTON US pages 3020 - 3024 L.MAROTEAUX ET AL 'Mouse 5HT1B serotonin receptor: Cloning, functional expression, and localization in motor control centres' voir le document en entier ---</p>	1,7,8, 10-13, 21-24
P,X	<p>MOLECULAR PHARMACOLOGY vol. 43 , Mars 1993 pages 313 - 319 H. MATTHES ET AL 'Mouse 5-hydroxytryptamine-5A and 5-hydroxytryptamine-5B receptors define a new family of serotonin receptors' voir le document en entier ---</p>	1-24
P,X	<p>PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA. vol. 90 , Avril 1993 , WASHINGTON US pages 3452 - 3456 M. ERLANDER ET AL 'Two members of a distinct subfamily of 5-hydroxytryptamine receptors differentially expressed in rat brain' voir le document en entier ---</p>	1-24
A	<p>TIPS vol. 13 , Avril 1992 pages 160 - 165 R. HEN 'Of mice and flies: commonalities among 5-HT receptors' -----</p>	